新型 YdjM 超家族成员的钠/氢逆向转运蛋白功能鉴定*

王艳红 刘艳双 石德喜 朱保国 吕保磊 付诗雨 徐 苗 王 伟 殷奎德**

（黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院 大庆 163319）

摘要 在原核生物中，钠/氢逆向转运蛋白具有催化细胞内的 Na^+、Li^+或 K^+等碱基阳离子的排出，换取外部质子，以降低有毒碱性金属阳离子的细胞质浓度和维持细胞内 pH 稳态起到了至关重要的作用。为了进一步挖掘中度嗜盐菌 *Halobacillus* Y5 中具有盐碱耐受性的钠/氢逆向转运蛋白基因并对其功能进行鉴定，我们首先提取该菌的基因组 DNA，然后采用 *Sau*3AI 随机酶切及功能互补的方法获得了一个新型的钠/氢逆向转运蛋白基因 *Ha_ydjM*。生物信息学分析表明，该基因属于 YdjM 超家族成员，是一个未知功能的膜蛋白，系统发育分析证实，其与来自 *Halobacillus* sp. Marseille –P 3789 的 YdjM（蛋白登录号 WP_101846656.1）家族成员聚在一起但形成独立分支。研究发现，该基因能够恢复大肠杆菌突变株 KNabc 对 0.2 M NaCl 和 5 mm LiCl 的耐受特性，并且耐受碱性 pH 8.0。功能分析显示，该蛋白呈现 pH 依赖的钠/氢逆向转运蛋白活性，转运动力学分析表明，Na^+、K^+、Li^+在 KNabc 中 K_m 值分别是 0.43 ± 0.05 mM、0.49 ± 0.06 mM、0.64 ± 0.06 mM，即对 Na^+、K^+、Li^+的亲和力分别是 $Na^+ > K^+ > Li^+$。综上所述，我们认为 Ha_ydjM 代表了一种新型的钠/氢逆向转运蛋白。该项研究丰富了 YdjM 超家族成员，并为其他未知膜蛋白功能分析提供依据。

关键词 钠/氢逆向转运蛋白 膜蛋白 功能鉴定 YdjM 超家族 喜盐芽胞杆菌

中图分类号 Q782

钠/氢逆向转运蛋白是与质子（H^+）输入相偶联并具有逆向转运 Na^+/H^+或同向转运 Na^+/OH^-的载体膜蛋白[1-4]，大多是 Na^+依赖型的 H^+转运和 H^+依赖型的 Na^+跨膜转运，并且普遍分布在原核细菌的膜囊、真核生物的线粒体、动植物细胞或组织中[5]。在高盐环境下，其可维持细胞质内正常的生理 pH，因此它在生物学上也发挥着至关重要的作用[6]。目前为止，原核生物中已经报道的钠/氢逆向转运蛋白家族主要包括 NhaA 家族、MFS 家族、Cpa1 家族、Cpa2 家族和 Cpa3 家族[7]。其中，NhaA 家族是许多肠道细菌和大肠杆菌中最为重要的钠/氢逆向转运蛋白。在微生物界中，源自大肠杆菌（*E. coli*）的 NhaA 是目前研究最为透彻的一种钠/氢逆向转运蛋白，同时也是细菌中第一个被发现的 Na^+/H^+

* 国家自然科学基金（31771692）、黑龙江八一农垦大学校内培育基金（XZR2016-11）资助项目

** 通讯作者，电子邮箱：yinkuide@163.com

逆向转运蛋白[8]。除此之外，人们在许多致病微生物中也发现了 NhaA 家族的其他 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白，如 *Vibrio cholerae*、*Clostridium tetani*、*Helicobacter pylori*、*Salmonella typhi* 等[9]。除了大肠杆菌主要的 Na^+/H^+逆向转运蛋白家族 NhaA 之外，原核生物中，还发现了 NapA，NhaP，NhaC，NhaD[10]和 NhaB、NhaE[11]。Etana Padan 等[12]将这些蛋白与 NhaA 家族相比，其同源性很小或基本没有。在大肠杆菌中，有三个最为重要的 Na^+/H^+逆向转运蛋白——NhaA[12]、NhaB[13]和 ChaA[14]。NhaA 能使大肠杆菌在高盐（Na^+/Li^+）胁迫下维持生长，并且在 Na^+存在的条件下，对其在碱性环境中的生长也是至关重要的[15]; NhaB 也是大肠杆菌中的 Na^+/H^+逆向转运蛋白，它是由 504 个氨基酸组成的具有十二个 TMS 的跨膜蛋白。这类蛋白只有在低浓度 Na^+或低 pH 时才行使其功能; ChaA 在碱性条件下，具有 Na^+（Ca^{2+}）/H^+逆向转运蛋白的活性[14]，而且此蛋白的表达能够影响胞内 K^+浓度，如果菌体缺乏基因 *chaA*，则 K^+的外排会受到抑制，故 ChaA 同时还有 K^+/H^+逆向转运蛋白的活性。因此，在大肠杆菌的耐盐能力上，缺少任何一种上述 Na^+/H^+逆向转运蛋白都会影响菌体的抗盐性，三者缺一不可。因此，实验中常用同时敲出 *nha*A 和 *nha*B 基因的盐敏感突变株 EP432，或是同时敲出 *nha*A、*nha*B 和 *cha*A 三个基因的盐敏感突变株 KNabc，通过功能互补法筛选和鉴定 Na^+（Li^+, K^+）/H^+逆向转运蛋白。本研究就是利用功能互补的方法从中度嗜盐菌 *Halobacillus* Y5 筛选到了新的钠/氢逆向转运蛋白基因 *Ha_ydjM*，然后对其功能进行鉴定，进一步丰富了 YdjM 家族成员，并为与其类似蛋白的研究提供可借鉴的理论基础。

1.1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及质粒

实验所用菌株中度嗜盐菌 *Halobacillus* Y5 由本实验室分离保存，盐碱敏感菌株 *E. coli* KNabc（Δ*nhaA*, Δ*nhaB*, Δ*chaA*）由东北农业大学微生物实验室提供，KNabc/pUC18 是将质粒 pUC18 经化学转化至 KNabc 的感受态细胞而得，KNabc/Ha_YdjM 为本实验获得的研究对象。

1.1.2 主要试剂及试剂盒

DNA 限制性内切酶：*Sau*3AI、T4 DNA 连接酶、Alkaline Phosphatase（CIAP）牛小肠碱性磷酸酶，购自日本 TaKaRa 公司；DNA 胶回收试剂盒购自美国 Omega 公司；其

他试剂均为分析纯。

1.1.3 培养基

LBK培养基：1 %蛋白胨、0.65%氯化钾和0.5 %酵母提取物，pH 值自然，121℃灭菌20 min，用于大肠杆菌KNabc培养；SG培养基：1 %蛋白胨、0.5 %酵母提取物、0.5 %酪蛋白、0.2 %氯化钾、0.3 %柠檬酸钠、2 %七水硫酸镁，3 %氯化钠，pH 值调至7.2-7.4，121℃灭菌20 min，用于*Halobacillus* Y5培养。

1.2 方法

1.2.1 *Halobacillus* Y5 总 DNA 提取

将*Halobacillus* Y5应用SG培养基在37℃，140 rpm培养约36 h后，4 ℃，2600×g，离心10 min，收集菌体，然后按着文献[16]的步骤提取其菌体的DNA，经1％琼脂糖凝胶电泳检测后于-20℃保存，备用。

1.2.2 Na^+/H^+逆向转运蛋白新基因筛选

参照王艳红等[17]方法构建 *Halobacillus* Y5 的基因文库，筛选钠/氢逆向转运蛋白基因的阳性克隆。

1.2.3 钠/氢逆向转运蛋白新基因序列分析

将上述筛选的阳性克隆质粒提取测序后，通过 NCBI 数据库 https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi 进行序列比对与分析；采用软件 DNAman 6.0 对开放式阅读框（ORF）、氨基酸多重序列比对；利用 http://web.expasy.org/protparam/对蛋白质的相对分子量和理论等电点进行分析；利用 http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html 进行启动子序列的预测；利用 http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py#forms::wordcount 对蛋白质序列跨膜区进行预测；采用软件 MEGA 5.1 的 Neighbor-Joining 法构建系统发育学进化树[18]。

1.2.4 耐盐碱能力测试

将序列分析后的钠/氢逆向转运蛋白新基因进行其耐盐碱能力的检测，以含有载体 pUC18 的菌株 KNabc（KNabc/pUC18）作为阴性对照，分别进行耐盐性实验和耐碱性实验，进行耐盐实验时配置含有不同浓度的 NaCl 或 LiCl 的 LBK 培养基，耐碱性实验则用 Tris-HCl 将 LBK 培养基调节成不同 pH 值，接种后于 37 ℃, 140 r/min 培养 16-18 h，取适量的菌液进行 OD_{600} 值测定[19]。

1.2.5 钠/氢逆向转运蛋白活性的测定

将新基因以及对照进行反转膜的制备[20]，然后采用 AO 荧光猝灭法[21]进行钠/氢逆向转运蛋白活性的测定。具体方法：将荧光参数进行设置：激发光（EX）波长 492 nm，发射光（EM）波长 526 nm；向石英杯中加入 2.5 mL 缓冲液 B 同时加入 2 μM 荧光指示剂吖啶橙（AO）和 40 μg 待测反转膜，抽吸混匀；然后加入反应底物 Tris-D-乳酸，终浓度为 5 mM，其作用通过呼吸链产生跨膜 pH 梯度，利用荧光分光光度计来监测ΔpH 的变化；当荧光强度下降至平衡状态时，再向反应缓冲液中加入终浓度为 5 mM 的 Na^+、K^+、Li^+，破坏ΔpH，根据荧光强度的恢复程度判断该蛋白是否具有 Na^+（Li^+，K^+）/H^+ 逆向转运蛋白的活性和大小。

1.2.6 K_m 值的测定

K_m 值存在的意义可表明蛋白与底物之间的亲和力，该值越大，表明亲和力越小，反之则相反。测试时，在最适 pH 条件下，选择不同浓度的 Na^+、K^+、Li^+测定转运蛋白活性大小，以离子浓度为横坐标，转运蛋白的活性为纵坐标进行非线性回归分析，计算 K_m 值的大小。

2 结 果

2.1 钠/氢逆向转运蛋白新基因筛选

采用含 0.2 M NaCl 的 LB 固体平板检测，恢复大肠杆菌（*E.coli*）KNabc 感受态细胞生长的阳性克隆菌约 150 株，测序分析后，其中 1 株可能为钠/氢逆向转运蛋白新基因，将其命名为 pUC-HaY，将其由北京华大基因生物科技有限公司测序，pUC-HaY 中插入的外源基因片段全长 3441 bp，包含 3 个可能的开放阅读框（ORF），其中 ORF1 预测编码甘氨酸甜菜碱转运蛋白基因 *opu*D 已发表[17]，ORF2 预测编码 NmrA 家族转录因子（因其一般不具有钠/氢逆向转运蛋白活性故不做进一步研究），ORF3 预测编码 YdjM 超家族的推测蛋白（登录号 MH536807），按着图 1 策略，即在 ORF3 两端设计带有酶切位点的引物，横线为设计 ORF3-F 和 ORF3-R 序列，用于扩增 ORF3；斜体为 *Xba*I（TCTAGA）和 *Kpn*I（GGTACC）；方框为 SD 序列，对其进行亚克隆，命名为 Ha_YdjM，作为本研究对象。

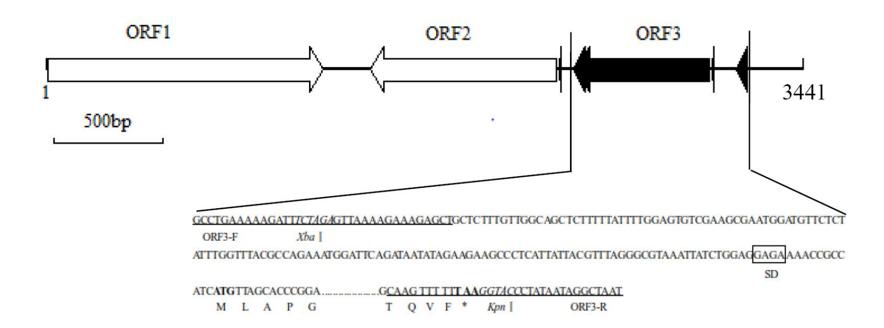


图1 Ha_YdjM的亚克隆策略

Fig. 1 Subcloning strategy of Ha_YdjM

2.2 Ha_YdjM 的序列分析

应用 DNAMAN 将 Ha_YdjM 与来自其他喜盐芽胞杆菌的蛋白进行比对，比对结果如图 2 所示，它与登录号 WP_101846656.1、WP_082235595.1、WP_035544181.1、WP_085031358.1、WP_014641626.1 蛋白的同源性分别为 86%、65%、57%、58%和 57%。

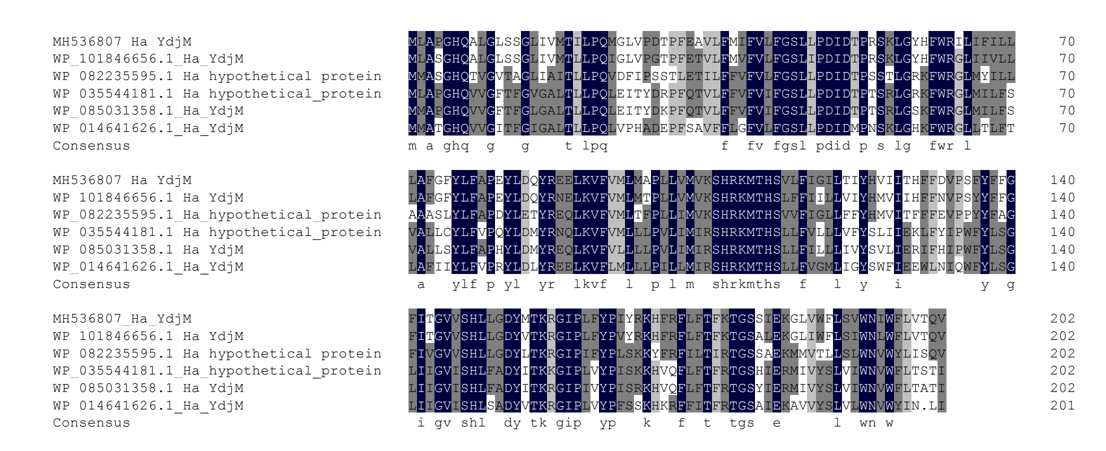


图 2 Ha_YdjM 与来自其他喜盐芽胞杆菌蛋白的比对

Fig. 2 Multiple alignment of Ha_YdjM along with other proteins from *Halobacillus*

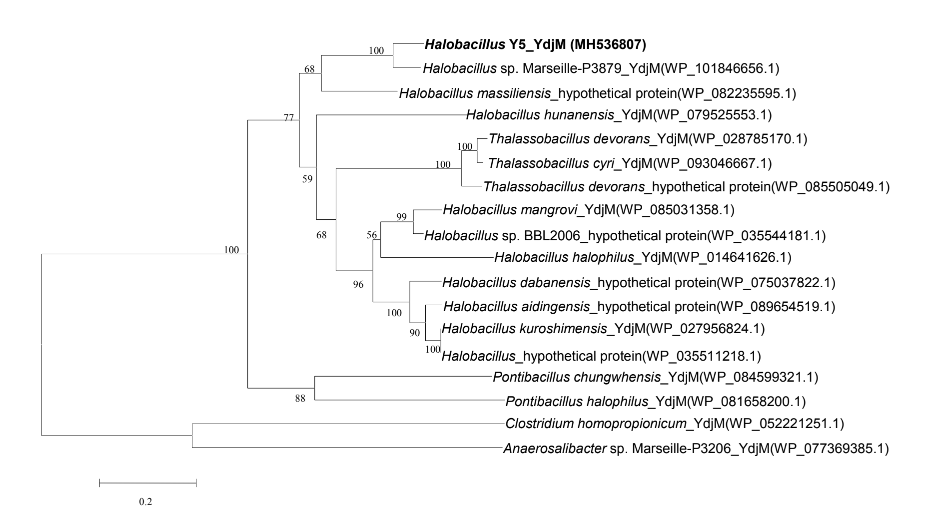
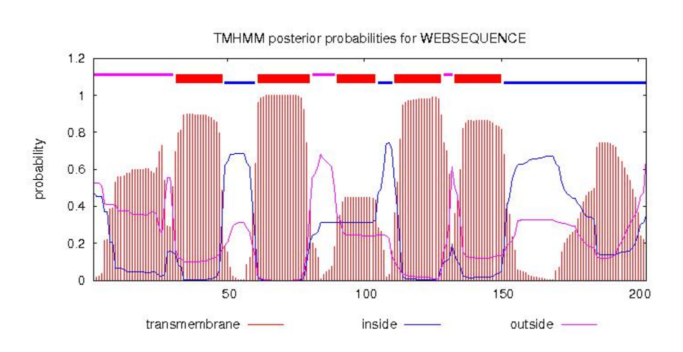


图 3 以氨基酸序列为基础的邻接法构建 Ha_YdjM 系统发育树

Fig. 3 Neighbour-joining phylogenetic tree of Ha_YdjM based on the amino acid sequence

通过 neighbour-joining 法构建的系统发育树（图 3）发现，与来自 *Halobacillus* sp. Marseille –P 3789 的 YdjM（蛋白号 WP_101846656.1）家族成员聚在一起但形成独立分支。因此，我们认为 Ha_YdjM 很可能是隶属于 YdjM 超家族的一个新成员。

已有研究表明，绝大部分的 Na^+/H^+逆向转运蛋白均为跨膜蛋白，因此，疏水性的氨基酸必定是其组成部分，而且存在一定数量的跨膜区。如果 Ha_YdjM 中的外源基因编码跨膜蛋白，疏水性氨基酸残基必然是其组成部分。所以，首先对 Ha_YdjM 进行跨膜分析，结果表明，其含有 5 个跨膜区（图 4）；疏水性分析表明，其编码的蛋白均为疏水性蛋白（图 5）。

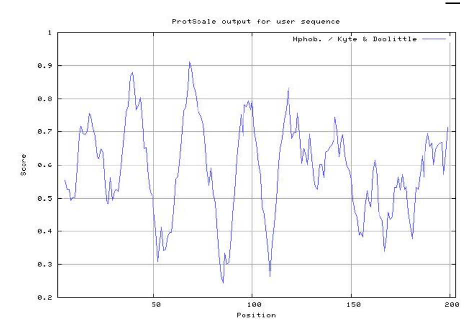


注：红色方块-跨膜区；粉色线-靠近周质空间一侧的亲水性环（Loop）

Note: red square - transmembrane; pink line - Hydrophilic loop near the periplasmic space

图 4 Ha_YdjM 的跨膜预测

Fig.4 Prediction of transmembrane helices for Ha_YdjM



注：正值代表疏水氨基酸、负值代表亲水氨基酸

Note: positive-hydrophobic amino acid, negative-hydrophilic amino acid

图 5 对 Ha_YdjM 编码蛋白进行疏水性分析

Fig.5 Hydrophobic property of deduced proteins for Ha_YdjM

Ha_YdjM 编码的蛋白含有 5 个跨膜区，由 203 个氨基酸组成，分子量为 23,637.42 Dalton，等电点 pI 为 9.33，跨膜蛋白从 31-150（表 1），包括 TMS I（31-48），TMSII（61-80），TMS III（90-104），TMS IV（111-128），TMS V（133-150）

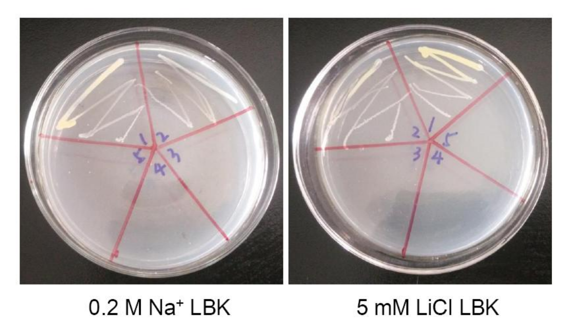
表 1 Ha_YdjM 推测的 5 个跨膜区域

Table 1 Five putative transmembrane segments of Ha_YdjM

TMS No.	N terminal	Amino acids	C terminal	length
1	31	PFEAVLFMIFVLFGSLLP	48	18
2	61	FWRILIFILLLAFGFYLFAP	80	20
3	90	LKVFVMLMAPLLVMV	104	15
4	111	THSVLFIGILTIYHVIIT	128	18
5	133	VPSFYFFGFITGVVSHLL	150	18

2.3 Ha_YdjM 耐盐碱能力测试

理论上 Ha_YdjM 为跨膜蛋白，应该具有耐盐碱能力，但为了实验的严谨，我们也将 ORF2 进行了测试，这里仅仅显示 0.2M LBK 和 5mM LiCl 的 LBK 固体平板结果（图 6），实验结果证实 Ha_YdjM 在盐敏感菌株中具有耐盐能力，而 ORF2 不能在实验条件下生长，与原来预测相符；耐碱结果表明（图 7），其可耐受至 pH 8.0，所以后期制备 Ha_YdjM 的反转膜进行活性测定。



注：1-pUC-HaY；2-Ha_YdjM；3-ORF2；4-pUC18 载体；5-未接种

Note: 1 - pUC-HaY; 2 - Ha_YdjM; 3 - ORF2; 4- pUC18 plasmid; 5 - uncultured bacteria

图 6 Ha_YdjM 的生长情况

Fig.6 Growth of Ha_YdjM

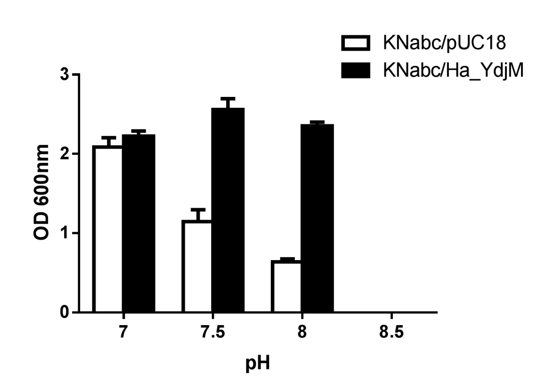


图 7 Ha_YdjM 的 pH 耐受能力测试

Fig.7 Growth test for pH resistence of Ha_YdjM

2.4 Ha_YdjM 的钠/氢逆向转运蛋白活性的测定

将 KNabc/Ha_YdjM 和对照 KNabc/pUC18 分别制备成反转膜(ISO)，以吖啶橙(AO)作为荧光检测剂，检测单价离子 Na^+（Li^+，K^+）/H^+的逆向转运蛋白活性。结果发现：当荧光猝灭至最小值时，加入一定浓度的 Na^+（Li^+，K^+）的溶液，KNabc/Ha_YdjM 的反转膜的荧光值会有不同程度的升高变化，而阴性对照 KNabc/pUC18 的荧光值无任何变化，即在荧光猝灭的最小值（图 8）。因此，我们认为 KNabc/Ha_YdjM 能够转运一价的 Na^+、Li^+、K^+，与跨膜分析结果一致，该蛋白具有 Na^+/H^+逆向转运蛋白活性。

通常情况下，pH 影响 Na^+（Li^+, K^+）/H^+逆向转运蛋白的活性，即蛋白处在不同 pH 环境下，其活性的大小可能有所不同。因此，我们在不同 pH（7.0-8.5）反应体系下，检测 KNabc/Ha_YdjM 对一价阳离子（Na^+、Li^+、K^+）的转运活性均随 pH 的变化而发生改变，而当其在 pH8.0 的反应缓冲液中，对一价阳离子（Na^+、Li^+、K^+）的转运活性最高（图 9），因此，我们认为 KNabc/Ha_YdjM 对单价阳离子 Na^+、Li^+、K^+的转运活性具有 pH 依赖性，并且活性随着 pH 的变化而发生改变。

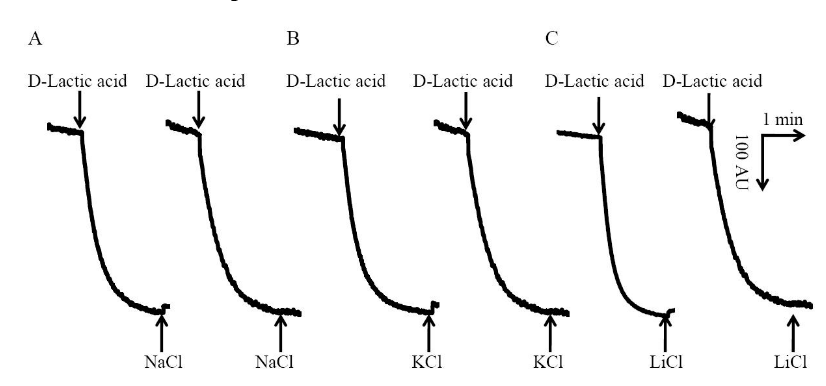


图 8 KNabc/Ha_YdjM 的 Na^+（Li^+，K^+）/H^+逆向转运蛋白活性的测定

Fig.8 Assays for Na^+（Li^+，K^+）/H^+ antiport activity of KNabc/Ha_YdjM

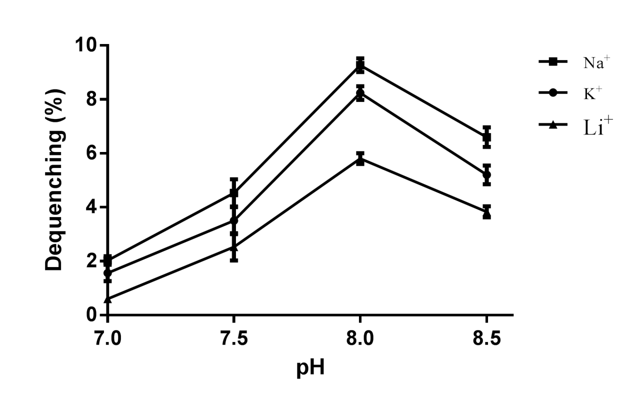


图9 不同pH KNabc/Ha_YdjM的Na^+（Li^+，K^+）/H^+逆向转运蛋白活性

Fig.9 Na^+（Li^+，K^+）/H^+ antiport activity of KNabc/Ha_YdjM at different pH

2.4 Ha_YdjM 转运蛋白 K_m 值的测定

我们已经明确 Ha_YdjM 能够转运 Na^+、Li^+、K^+三种单价阳离子，并且对三者的转运能力是不同的，也就意味着 Ha_YdjM 对不同的转运底物具有不同的偏好能力，K_m 值的研究表明，该值越小，表示对底物的亲和能力越强。应用 GraphPad Prism 6.01 软件，通过米氏方程计算 Na^+、K^+、Li^+的 K_m 值分别是 0.43 ± 0.05 mM、0.49 ± 0.06 mM、0.64 ± 0.06 mM（图 10），也就意味着 Ha_YdjM 对 Na^+、Li^+、K^+的亲和力大小依次是 $Na^+ > K^+ > Li^+$。

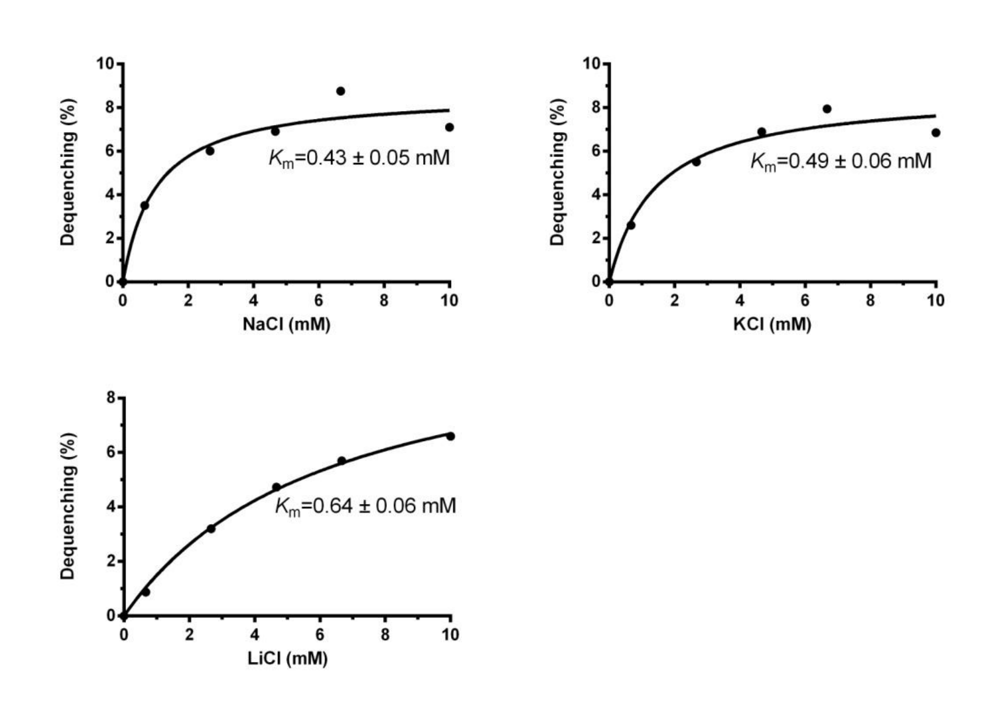


图 10 KNabc/Ha_YdjM 的 $K_m^{Na+(Li+, K+)}$ 的计算
Fig.10 Calculation of $K_{0.5}$ values of KNabc/Ha_YdjM for Na^+, Li^+ and K^+

3. 讨论

本研究中，我们首先建立了中度嗜盐菌 *Halobacillus* Y5 的基因文库，然后通过功能互补得到了新的钠/氢逆向转运蛋白新基因 *Ha_ydjM*。对实验结果进行分析发现，来自 *Halobacillus* Y5 的蛋白 Ha_YdjM 属于 YdjM 超家族的新成员，并与来自 *Halobacillus* sp. Marseille –P 3789 的 YdjM（蛋白登陆号 WP_101846656.1）氨基酸序列同源性最高，而且聚在一起但形成独立分支。在以大肠杆菌突变株 KNabc 作为宿主菌时，能够恢复其在 0.2 M NaCl 和 5 mm LiCl 的生长特性，并且具有一定的碱耐受性。功能研究表明该蛋白呈现 pH 依赖的钠/氢逆向转运蛋白活性，并且 K_m 值实验表明 Ha_YdjM 蛋白对 Na^+、Li^+、K^+的亲和力大小依次是 $Na^+ > K^+ > Li^+$。所以，我们认为 Ha_ydjM 代表了新的 YdjM 超家

族成员并明确其钠/氢逆向转运蛋白功能。

目前，仍然有许多蛋白质家族的功能是未知的，而发现这些功能是后基因组生物学的基本任务，尤其是对于成员分布较广泛的家族[22]。蛋白Ha_YdjM属于YdjM超家族，但其功能不同于已有的YdjM家族成员，是一类新的蛋白。YdjM超家族多为一类金属离子依赖的酶，但其种类与作用机制各不相同，如乙酰化酶[23]，脱乙酰酶的区域由精氨酸酶和乙酰化酶组成的多链状的α-螺旋包围的β-折叠，并且二价的金属离子作为辅助因子，其是癌症和表观遗传的调控者；Huang Lili et al[22]研究认为DUF89蛋白在代谢破坏调控中具有金属离子依赖的磷酸酶活性，以独立或融合蛋白的形式存在，并因为对不同的离子有不同的偏好分为不同的亚科；另外和磷酸酶相关的研究还有金属依赖是蛋白磷酸酶，其可以为细胞外的磷酸激酶的调控[24]；还有来自嗜热真菌*Malbranchea cinnamomea*[25]的金属依赖的水解酶并没有明显的水解特性，反而在1 mM Mn^{2+}存在下具有糖化酶的特性，这一结果说明仅在序列上有同源性的未必功能就相同。来自*Pigmentiphaga* sp. Strain DL-8 的CbaA[26]水解蛋白，编码339个氨基酸残基，能够被Mg^{2+}、Ni^{2+}、Ca^{2+}、Zn^{2+}等金属离子激活，只有保守氨基酸组氨酸288和谷氨酸301作为质子的供体与受体，同源重组结果表明缺失CbaA的*Pigmentiphaga* sp. Strain DL-8不能降解6-氯-2苯并噁唑啉酮（CDHB），*cbaA*是菌株*Pigmentiphaga* sp. Strain DL-8降解CDHB的关键基因。在真核生物布氏锥虫（*Trypanosoma brucei*）中，Marschner A et al[27]等曾研究甲硫氨酸氨肽酶也是金属依赖的，该酶对蛋白的转录后加工以及发现新药具有重要作用。而我们所研究的来自*Halobacillus* Y5的蛋白Ha_YdjM的确不同于已发现的上述蛋白，虽然在同源比对时其具有金属依赖的酶的活性，但是由于我们的筛选初衷是为了得到新的钠/氢逆向转运蛋白而利用的是功能互补以及盐敏感突变株，而筛选的阳性克隆又恰好将突变株互补，并且检测到钠/氢逆向转运蛋白活性，所以本研究的Ha_YdjM蛋白是国内首次报道的属于YdjM家族并具有钠/氢逆向转运蛋白活性的新蛋白，补充并丰富了YdjM家族的成员，为其后续研究奠定坚实的理论基础。

参考文献

[1] Uzdavinys P, Coincon M, Nji E, et al. Dissecting the proton transport pathway in electrogenic Na^+/H^+ antiporters. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2017, 114(7): 1101-1110.

[2] Padan, E. & Schuldiner, S. Molecular physiology of Na^+/H^+ antiporters, key transporters

in circulation of Na^+ and H^+ in cells. Biochim. Biophys. Acta, 1994, 1185(2): 129-151

[3] Ito, M., Guffanti, A. A., Oudega, B. & Krulwich, T. A. *mrp*, a multigene, multifunctional locus in *Bacillus subtilis* with roles in resistance to cholate and to Na^+ and in pH homeostasis. J. Bacteriol. 1999, 181(8): 2394-2402.

[4] Padan, E., Bibi, E., Ito, M. & Krulwich, T. A. Alkaline pH homeostasis in bacteria: new insights. Biochim. Biophys. Acta, 2005, 1717(2): 67-88.

[5] Jr S M, Reddy V S, Tamang D G, et al. The transporter classification database. Nucleic Acids Research, 2014, 42(Database issue): 251-258.

[6] Quinn M J, Resch C T, Sun J, et al. NhaP1 is a $K^+(Na^+)/H^+$ antiporter required for growth and internal pH homeostasis of *Vibrio cholerae* at low extracellular pH[J]. Microbiology, 2012, 158(4): 1094-1105.

[7] 杨礼富，赵百锁，杨苏声．细菌钠离子输出系统的类型及其可能机制．微生物学报，2007, 47(6): 1110-1114.

YANG L F, ZHAO B S, YANG S S. Sodium ion transportation system and its possible mechanisms in Bacteria. Acta Microbiologica Sinica, 2007, 47(6): 1110-1114.

[8] Padan E. Functional and structural dynamics of NhaA, a prototype for Na^+ and H^+ antiporters, which are responsible for Na^+ and H^+ homeostasis in cells. Biochimica Et Biophysica Acta, 2014, 1837(7): 1047-1062.

[9] Dwivedi M, Sukenik S, Friedler A, et al. The Ec-NhaA antiporter switches from antagonistic to synergistic antiport upon a single point mutation. Scientific Reports, 2016, 6:23339.

[10] Zhang H, Wang Z, Wang L, et al. Cloning and identification of a novel NhaD-type Na^+/H^+ antiporter from metagenomic DNA of the halophilic bacteria in soil samples around Daban Salt Lake. Extremophiles, 2014, 18(1): 89-98.

[11] Sousa P M, Videira M A, Vorburger T, et al. The novel NhaE-type Na^+/H^+ antiporter of the pathogenic bacterium *Neisseria meningitidis*. Archives of Microbiology, 2013, 195(3): 211-217.

[12] Pinner E, Carmel O, Bercovier H, et al. Cloning, sequencing and expression of the *nhaA* and *nhaR* genes from *Salmonella entiritidis*. Archives of Microbiology, 1992, 157(4): 323-328.

[13] Cui Y, Cheng B, Meng Y, et al. Expression and functional analysis of two NhaD type antiporters from the halotolerant and alkaliphilic *Halomonas* sp. Y2. Extremophiles, 2016, 20(5): 1-9.

[14] Ohyama T, Igarashi K, Kobayashi H. Physiological role of the *chaA* gene in sodium and

calcium circulations at a high pH in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 1994, 176(14): 4311-4315.

[15] 徐宁，程海娇，刘清岱，等．细菌 Na^+/H^+逆向转运蛋白的研究进展．微生物学通报，2015, 42(10): 2002-2011.

XU N, CHENG H J, LIU Q D et al. Research progress of the Na^+/H^+ antiporters in bacteria. Microbiology China, 2015, 42(10): 2002-2011.

[16] Fakharany E E, Hassan M. A universal method for extraction of genomic DNA from various microorganisms using lysozyme. New Biotechnology, 2016, 33:S210-S210.

[17] 王艳红，曹宁，贾桂燕，等．中度嗜盐菌 *Halobacillus* Y5 甘氨酸甜菜碱转运蛋白 *opuD* 基因的克隆及功能分析．中国生物制品学杂志, 2017, 30(3): 258-263.

WANG Y H, CAO N, JIA G Y et al. Cloning and functional identification of glycine betaine-cholinecarnitine transporter *opuD* gene from *Halobacillus* Y5. Chinese Journal Biologicals, 2017, 30(3): 258-263.

[18] Som A, Fuellen G. The effect of heterotachy in multigene analysis using the neighbor joining method. Molecular Phylogenetics & Evolution, 2009, 52(3):846-851.

[19] Meng L, Meng F, Zhang R, et al. Characterization of a novel two-component $Na^+(Li^+, K^+)/H^+$ antiporter from *Halomonas zhaodongensis*. Scientific Reports, 2017, 7(1): 4221-4234.

[20] Rosen B P. Ion extrusion system in *Escherichia coli*. Methods in Enzymology, 1986, 125(1): 328-336.

[21] Wang Y, Song N, Yang L, et al. A novel NhaD-type Na^+/H^+ antiporter from the moderate halophile and alkaliphile *Halomonas alkaliphila*. Canadian Journal of Microbiology, 2017, 63(7):596-607.

[22] Huang L, Khusnutdinova A, Nocek B, et al. A family of metal-dependent phosphatases implicated in metabolite damage-control. Nature Chemical Biology, 2016, 12(8): 1-8.

[23] López J E, Sullivan E D, Fierke C A. Metal-dependent Deacetylases: Cancer and Epigenetic Regulators. Acs Chemical Biology, 2016, 11(3): 706-729.

[24] Li R, Gong Z, Pan C, et al. Metal-dependent protein phosphatase 1A functions as an extracellular signal-regulated kinase phosphatase. Febs Journal, 2013, 280(11): 2700-2711.

[25] Mahajan C, Basotra N, Singh S, et al. *Malbranchea cinnamomea* : A thermophilic fungal source of catalytically efficient lignocellulolytic glycosyl hydrolases and metal dependent enzymes. Bioresource Technology, 2015, 200: 55-63.

[26] Dong W, Wang F, Huang F, et al. Erratum for Dong et al. Metabolic Pathway Involved in 6-Chloro-2-Benzoxazolinone Degradation by *Pigmentiphaga* sp. Strain DL-8 and Identification of the Novel Metal-Dependent Hydrolase CbaA. Appl Environ Microbiol, 2016, 82(14): 4169-4179.

[27] Marschner A, Klein C D. Metal promiscuity and metal-dependent substrate preferences of *Trypanosoma brucei*, methionine aminopeptidase 1. Biochimie, 2015, 115: 35-43.

Functional Identification of Na^+/H^+ Antiporter in Novel YdjM Superfamily Members

WANG Yan-hong LIU Yan-shuang SHI De-xi ZHU Bao-guo LV Bao-lei FU Shi-yu XU Miao WANG Wei YIN Kui-de

(College of Life Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, 163319)

Abstract: In prokaryotes, Na^+/H^+ antiporters catalyze the efflux of intracellular alkali cations such as Na^+, Li^+ or K^+ in exchange for external protons, which play a vital role in reducing the cytoplasmic concentration of toxic alkali cations and supporting intracellular pH homeostasis under alkaline conditions. To obtain as many (especially novel) Na^+/H^+ antiporter genes as possible, genomic DNA from the *Halobacillus* Y5 was screened, then partially digested with *Sau*3AI selected in *E. coli* KNabc, which lacks three major Na^+/H^+ antiporters. The gene designated *Ha_ydjM* (*ydjM* from the *Halobacillus* Y5) was screened, which showed the noval Na^+/H^+ antiporter, belong to a member of YdjM superfamilly. It is a membrane protein of unknown function. Phylogenetic analysis based on the neighbour-joining algorithm showed that Ha-YdjM showed the closer phylogenetic relationship with YdjM(accession version No. WP_101846656.1) from *Halobacillus* sp. Marseille –P 3789 but it is a separate branch. The presence of Ha-YdjM conferred tolerance of *E. coli* KNabc to NaCl up to 0.2 mol •$L^{-1}$and to LiCl up to 5 mmol •L^{-1} and to an alkaline pH 8.5. pH-dependent Na^+/H^+ antiport activity was detected from everted membrane vesicles prepared from *E. coli* KNabc/Ha-YdjM but not those of KNabc/pUC18. The Michaelis-Menten kinetics analysis showed that K_m values for Na^+, K^+, Li^+ were 0.43 ± 0.05 mM、0.49 ± 0.06 mM、0.64 ± 0.06 mM, respectively, indicating that the preference of Ha-YdjM for the transported cations was $Na^+ > K^+ > Li^+$. Taken together, Ha_ydjM represents a novel Na^+/H^+ antiport. This study found new members of the YdjM superfamily and provided insights for functions of other unknown membrane members.

Key words Na^+/H^+ antiporter membrane proteins functional identification YdjM superfamily *Halobacillus*